

**JP04278088A**

## MicroPatent Report

## DNA FRAGMENT CONTAINING GENE CAPABLE OF CODING BIOTIN SYNTHETASE AND ITS UTILIZATION

**[71] Applicant: MITSUBISHI PETROCHEM CO LTD**

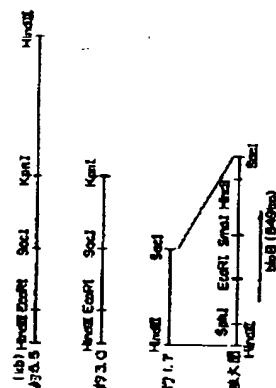
**[72] Inventors:** HATAKEYAMA KAZUHISA;  
KOHAMA KEIKO;  
HOSOGANE MAYUMI;  
KOBAYASHI MIKI ...

**[21] Application No.: JP03062563**

**[22] Filed: 19910304**

**[43] Published: 19921002**

**Go to Fulltext**



**[57] Abstract:**

**PURPOSE:** To provide a method for analyzing and isolating a gene participating in biosynthesis of biotin in a coryneform bacterium, transducing the aforementioned gene into a coryneform bacterium of the same species and efficiently obtaining the aforementioned genetic product from the coryneform bacterium. **CONSTITUTION:** A DNA fragment containing a gene capable of coding biotin synthetase is isolated from a strain of *Brevibacterium flavum* MJ-233 and the base sequence of the resultant gene is determined. The biotin synthetase is highly produced by the *Brevibacterium flavum* MJ-233 transformed with a plasmid capable of replicating and proliferating in a coryneform bacterium into which the DNA fragment containing the gene capable of coding the aforementioned biotin synthetase is introduced. **COPYRIGHT:** (C)1992, JPO&Japio

[51] Int'l Class: C12N01552 C12N00121 C12N00900 C12N01577  
C12N01552 C12R00113 C12N01552 C12R00115 C12N00121 C12R00113  
C12N00121 C12R00115 C12N00900 C12R00113 C12N00900 C12R00115

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-278088

(43) 公開日 平成4年(1992)10月2日

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/52	Z N A	7236-4B		
1/21		7823-4B		
9/00				
15/77		8828-4B		
			C 1 2 N 15/00	A
審査請求 未請求 請求項の数10(全 20 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平3-62563

(22) 出願日 平成3年(1991)3月4日

(71) 出願人 000006057

三菱油化株式会社

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

(72) 発明者 畠山 和久

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号三

菱油化株式会社筑波総合研究所内

(72) 発明者 小浜 恵子

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号三

菱油化株式会社筑波総合研究所内

(72) 発明者 細金 真由美

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号三

菱油化株式会社筑波総合研究所内

(74) 代理人 弁理士 小田島 平吉 (外1名)

最終頁に続く

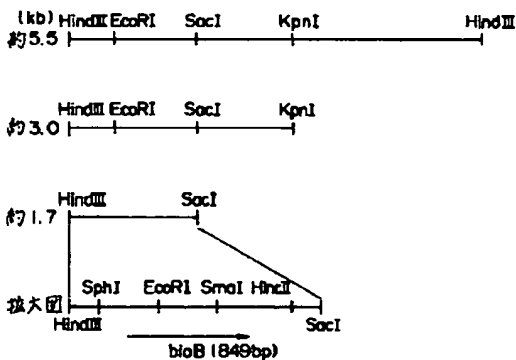
(54) 【発明の名称】 ビオチンシンセターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片およびその利用

(57) 【要約】 (修正有)

【目的】 コリネ型細菌のビオチン生成に関与する遺伝子を解析・単離し、該遺伝子を同種であるコリネ型細菌に導入し、該遺伝子産物を効率的にコリネ型細菌から取得する方法の提供。

【構成】 プレバクテリウム・フラバムMJ-233株からビオチンシンセターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を単離し、この遺伝子の塩基配列を決定した。

【効果】 上記ビオチンシンセターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を導入したコリネ型細菌内で複製増殖可能なプラスミドで形質転換されたプレバクテリウム・フラバムMJ-233は、ビオチンシンセターゼを高産生した。



1

2

【特許請求の範囲】

【請求項1】 コリネ型細菌由来のビオチンシンセターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片。

【請求項2】 コリネ型細菌がビオチン要求性の菌株である請求項1記載のDNA断片。

【請求項3】 ビオチン要求性のコリネ型細菌がブレバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) M\*

\* J-233である請求項2記載のDNA断片。

【請求項4】 大きさが約5.5kb、約3.0kbまたは約1.7kbである請求項2記載のDNA断片。

【請求項5】 次のDNA塩基配列で表されるビオチンシンセターゼをコードする遺伝子DNA断片。

【化1】

```

ATGACAATCC CCGCCACCAT CCTGACACCC GCGCGACCC AAGTTCTGGA ACAGGGAATT 60
GGCCTTAATC AGCAGCAGTT GATGGAGGTT CTCACCTTGC CTGAAGAACA AATCCCAAGC 120
TTGATGGAAT TAGCCACCA GGTTCGGTTC AAGTGTGTG GAGAGGAAAT CSAGGTAGAG 180
GGCATTATTT CCTCAAAAC TGGCGGTTC CCTGAAGATT GCCATTTCG CTCACAGTCT 240
GGGTGTGTTT AATCGCCGCT GGCCTCGGTG TGGCTGGATA TTCCGAATCT GGTGAAAGCC 300
GCTAAACAGA CCGCAAAAC TGGCGCTACC GAATTCGATT TCGTCGCCGC AGTCAAGGGC 360
CCTGATGAGA GGCCTCATGAC CACGCTGGAG GAAAGCATCC TCGCGATTCA CTCGAAAGTT 420
GAAATTGAAG TCGCAGCATC FATCGGAACG TTAATAAAG AACAGGTGGA TCGCCTCGCT 480
GCTGCCGGCG TGCACCGCTA CAACCATAA TTAGAACTG CGCGTTCTTA TTTCCTGAA 540
GTTGTACCA CTCATACATG GGAAGAGCGC CGCGAACTT TCGCGCTGCT GGCAGAGCT 600
GGAATGGAAG TCTGTTCCGG CGGAATCTTA GGAATGGCG AACTTTAGA GCAGCGCGCC 660
GAGTTTCCCG TGCAGCTGSC GAGCTTGAT CCGSACGAAG TCCCATGAA CTTCCTTGT 720
CCTCGTCCGG ACACCCCAT TGCCTATAGG AATGTATGGA CAGCCGTGAC GCTCTGCTCT 780
CATATTGGTG CGTTCCGCT TCGATGCTT CACACCATGC TTGTTTTCG TGGCGGTGCG 840
GAGCTGACTT TGGGCGACAA GGGTTCCGAG CAAGCCCTCC TGGGAGGCAT CAATGCCATG 900
ATCGTCGGA ACTACCTGAC CAGGCTCGGC CGCCCAATGG AAGATGACCT CGACATGATG 960
GATCGTCTCC AGCTGCCCAT CAAAGTCTT AATAAGGTCA TCTAA 1005

```

【請求項6】 次のアミノ酸配列に表されるビオチンシンセターゼをコードする遺伝子DNA断片。

【化2】

3 4

Met Thr Ile Pro Ala Thr Ile Leu Asp Thr Ala Arg Thr Gln Val Leu  
1 5 10 15

Glu Gln Gly Ile Gly Leu Asn Gln Gln Leu Met Glu Val Leu Thr  
20 25 30

Leu Pro Glu Glu Gln Ile Pro Asp Leu Met Glu Leu Ala His Gln Val  
35 40 45

Arg Leu Lys Trp Cys Gly Glu Glu Ile Glu Val Glu Gly Ile Ile Ser  
50 55 60

Leu Lys Thr Gly Gly Cys Pro Glu Asp Cys His Phe Cys Ser Gln Ser  
65 70 75 80

Gly Leu Phe Gln Ser Pro Val Ala Ser Val Trp Leu Asp Ile Pro Asn  
85 90 95

Leu Val Glu Ala Ala Lys Gln Thr Ala Lys Thr Gly Ala Thr Glu Phe  
100 105 110

Asp Phe Val Ala Ala Val Lys Gly Pro Asp Glu Arg Leu Met Thr Gln  
115 120 125

Leu Glu Glu Ala Val Leu Ala Ile His Ser Glu Val Glu Ile Glu Val  
130 135 140

Ala Ala Ser Ile Gly Thr Leu Asn Lys Gln Gln Val Asp Arg Leu Ala  
145 150 155 160

Ala Ala Gly Val His Arg Tyr Asn His Asn Leu Glu Thr Ala Arg Ser  
165 170 175

Tyr Phe Pro Glu Val Val Thr Thr His Thr Trp Glu Glu Arg Arg Glu  
180 185 190

Thr Leu Arg Leu Val Ala Glu Ala Gly Met Glu Val Cys Ser Gly Gly  
195 200 205

Ile Leu Gly Met Gly Glu Thr Leu Glu Gln Arg Ala Glu Phe Ala Val  
210 215 220

Gln Leu Ala Glu Leu Asp Pro Asp Gln Val Pro Met Asn Phe Leu Asp  
225 230 235 240

Pro Arg Pro Gly Thr Pro Phe Ala Asp Arg Asn Val Trp Thr Ala Val  
245 250 255

Thr Leu Trp Pro His Ile Gly Ala Phe Arg Leu Ala Met Pro His Thr  
260 265 270

Met Leu Arg Phe Ala Gly Gly Arg Glu Leu Thr Leu Gly Asp Lys Gly  
275 280 285

Ser Glu Gln Ala Leu Leu Gly Gly Ile Asn Ala Met Ile Val Gly Asn  
290 295 300

Tyr Leu Thr Thr Leu Gly Arg Pro Met Glu Asp Asp Leu Asp Met Met  
305 310 315 320

Asp Arg Leu Gln Leu Pro Ile Lys Val Leu Asn Lys Val Ile  
325 330

【化3】

【請求項7】 請求項1～6のいずれかに記載されたDNA断片が導入された組換えプラスミド。

【請求項8】 請求項1～6のいずれかに記載されたDNA断片と、プラスミドpBY503に由来するコリネ型細菌内で複製増殖機能を司る遺伝子を含むDNA断片及び安定化機能を司る遺伝子を含むDNA断片を保有する組換えプラスミド。

【請求項9】 請求項7～8のいずれかに記載の組換えプラスミドで形質転換されたコリネ型細菌。

【請求項10】 請求項9記載のコリネ型細菌を培養し、培養物中にピオチンシンターゼを生成せしめることを特徴とするピオチンシンターゼの製造法。

【発明の詳細な説明】

50 【0001】

5

【産業上の利用分野】本発明は、ビオチンシンターゼ（すなわちデスチオビオチンからビオチンの生合成反応に関与する酵素）をコードする遺伝子を含むコリネ型細菌由来のDNA断片、該DNA断片を含む組換えプラスミド、該組換えプラスミドで形質転換されたコリネ型細菌及び該コリネ型細菌を用いるビオチンシンターゼの製造法に関する。

【0002】ビオチンシンターゼは、ビオチン生合成に関与する酵素の一つであり、ビオチン製造における産業上有用な酵素である。

【0003】またビオチンは、ヒト、動物、植物及びある種の微生物の生育に必要とされるビタミンの1種であり、特に皮膚代謝の調整剤として、あるいはヒトの脱毛防止剤として、あるいは、家畜飼料への添加剤として用いられる有用な物質である。

【0004】従来、微生物を用いたビオチンの製造法としては、バチルス (*Bacillus*) 属、エシエリヒア (*Escherichia*) 属、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 属、クロモバクテリウム (*Chromobacterium*) 属、シユードモナス (*Pseudomonas*) 属、アースロバクター (*Art* 40 *hrobacter*) 属等の微生物を用いる方法が知られている（特開昭56-160998号公報）。またこれら野生株に人工的に突然変異を生起させてビオチン生産能を付与する方法も提案されている（例えば H. Yamagata et al, *Agri. Biol. Chem.*, 47, 1611, 1983）。

【0005】しかしながら、微生物を用いてビオチンを製造しようとする場合、野生株はビオチンによる強力なフィードバック抑制機構のため (Y. Izumi, K. Ogata, *Adv. Appl. Microbial.*, 22, 155-157, 1977)、ビオチンは極少量しか生成されない。また変異株を用いる方法でも生成量は必ずしも満足し得るものではなかった。

【0006】また、工業的利用上多くの利点を有するブレバクテリウム属およびコリネバクテリウム属細菌を含むコリネ型細菌のある種の菌株、例えばブレバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) MJ-2 33、ブレバクテリウム・ラクトファーメントム (*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC 13869、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutanicum*) ATCC 31831、ブレバクテリウム・アンモニアゲネス (*Brevibacterium ammoniagenes*) ATCC 13745等はビオチン要求性を有しており、ビオチンを全く生産しないことが知られている。

【0007】ビオチンの生合成に関与する遺伝子としては、エシエリヒア・コリ (*Escherichia coli*) 由来の遺伝子がよく研究されており、bioA、bioB、bioC、bioD、bioF、bioH遺伝子が存在することが知られている。このうち、bioAは7,8-ジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ、bioBはビオチンシンターゼ、bioCはビメリルCoA 50

6

シンターゼ、bioDはデスチオビオチンシンターゼ、bioFは7-ケト-8-アミノペラルゴン酸シンターゼをそれぞれコードすることが知られ、bioHについては、その働きは、まだ明らかでない (A. J. Otsuka et. al., *J. Biol. Chem.* 263, 19577-19585, 1988)。また、bioA、bioB、bioC、bioD、bioF遺伝子はbioABFCDなるオペロンを形成しており、その発現は、bioAとbioB遺伝子の間に存在するオペレーターにより制御されることがわかっている。また、そのオペレーターの制御は、bioA遺伝子にコードされたビオチンリプレッサーが、ビオチンにより活性化されることによりオペレーターに結合し、ビオチン生合成オペロンの発現を抑制することが知られている (*J. Biol. Chem.* 263, 1013-1016, 1988)。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】この発明は、コリネ型細菌のビオチン生合成に関与する遺伝子を解析・単離し、該遺伝子を同種であるコリネ型細菌に導入し、該遺伝子産物を効率的にコリネ型細菌から取得することを目的としてなされたものである。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた。その結果、ビオチン要求性の大腸菌変異株を用いる交差相補性試験により、ビオチン要求性のコリネ型細菌は少なくともbioB、bioA、bioDの3種のビオチン生合成に関与する遺伝子を保有していることが明らかとなり、該遺伝子を適当なベクタープラスミドに導入して、コリネ型細菌を形質転換し、該コリネ型細菌を培養することにより、培養物中に効率的にビオチン生合成に関与する酵素が生成することを見出し本発明を完成するに至った。かくして本発明によれば、(1) コリネ型細菌由来のビオチンシンターゼをコードする遺伝子 (bioB) を含むDNA断片、(2) 該DNA断片が導入された組換えプラスミド、(3) 該組換えプラスミドで形質転換されたコリネ型細菌、(4) 該コリネ型細菌を培養し、培養物中にビオチンシンターゼを生成せしめることを特徴とするビオチンシンターゼの製造法、が提供される。

【0010】以下本発明についてさらに詳細に説明する。本発明の「ビオチンシンターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片」（以下これを「bioB断片」と略称することがある）は、デスチオビオチンからビオチンへの変換反応を触媒する酵素、すなわちビオチンシンターゼをコードする遺伝子 (bioB) を含むDNA断片である。

【0011】上記bioB断片の供給源となる微生物は、コリネ型細菌であれば特に限定されるものではないが、一般的には、ブレバクテリウム・フラバム MJ-2 33 (FERM BP-1497) およびその由来

7

株、プレビバクテリウム・アンモニアゲネス (*Brevibacterium ammoniagenes*) ATCC 6871、同 ATCC 13745、同 ATCC 13746、プレビバクテリウム・デバリカタム (*Brevibacterium divaricatum*) ATCC 14020、プレビバクテリウム・ラクトファーマンタム (*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC 13869、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 31831等が有利に使用される。

【0012】これらの供給源微生物からbioB断片を調製するための基本的操作の一例を述べれば次のとおりである。

【0013】すなわち、bioB断片の調製は、上記コリネ細菌、例えばプレビバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) MJ-233 (FERM BP-1497) 株の染色体上に存在し、この染色体を適当な制限酵素で切断することにより生ずる切断断片の中から以下に述べる方法で分離、取得することができる。先ず、プレビバクテリウム・フラバム MJ-233 株の培養物から染色体DNAを抽出する。この染色体DNAを適当な制限酵素、例えばSau3AIを用いて、DNA断片の大きさが約20~30kbになるように部分分解する。

【0014】得られたDNA断片をコスミドベクター、例えばpWE15に挿入し、このコスミドをλ DNA in vitro Packaging Kitを用いる形質導入により、bioBの欠損した大腸菌変異株 (*Journal of Bacteriology*, vol 94, p 2065-2066, 1967及び *Journal of Bacteriology* vol 112, p 830-839, 1972参照) に導入する。この大腸菌変異株を、ピオチンを含まない選択培地に塗抹する。

【0015】得られる形質転換株よりコスミドDNAを抽出し、制限酵素で解析することにより挿入されたプレビバクテリウム・フラバム MJ-233 株染色体由来のbioB断片を確認・取得することができる。かくして得られるbioB断片は、大きさが約20~30kbと大きく、実用的でないので、さらに短い断片に特定化する必要がある。

【0016】次に、上記で得られたbioA、bioD断片を含むコスミドを適当な制限酵素を用いて切断し、得られるDNA断片を、大腸菌で複製可能なベクタープラスミドに挿入しこのベクタープラスミドを通常用いられる形質転換法、例えば、塩化カルシウム法、電気パルス法による形質転換により、前記bioBの欠損した大

8

腸菌変異株に導入し、この大腸菌変異株をピオチンを含まない選択培地に塗抹する。

【0017】得られる形質転換株よりプラスミドDNAを抽出し、制限酵素で解析することにより挿入されたプレビバクテリウム・フラバム MJ-233 株染色体由来のbioB断片を確認・取得することができる。

【0018】このようにして得られるbioB断片の一つは、上記プレビバクテリウム・フラバム MJ-233 株の染色体DNAを制限酵素Sau3AIの部分分解により切り出し、さらにそれを制限酵素Hind IIIで切り出すことにより得られる大きさが約5.5kbのDNA断片を挙げることができる。

【0019】この約5.5kbのピオチンシンセターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を、各種の制限酵素で切断したときの認識部位数及び切断断片の大きさを下記表1に示す。

【0020】なお、本明細書において、制限酵素による「認識部位数」は、DNA断片又はプラスミドを、過剰の制限酵素の存在下で完全分解し、それらの分解物をそれ自体既知の方法に従い1%アガロースゲル電気泳動およびポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、分離可能な断片の数から決定した値を採用した。

【0021】また、「切断断片の大きさ」及びプラスミドの大きさは、アガロースゲル電気泳動を用いる場合には、エシエリヒア・コリのラムダファージ (λ phage) のDNAを制限酵素Hind IIIで切断して得られる分子量既知のDNA断片の同一アガロースゲル上での泳動距離で描かれる標準線に基づき、また、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いる場合には、エシエリヒア・コリのファイ・エックス174ファージ (φ x 174 phage) のDNAを制限酵素Hae IIIで切断して得られる分子量既知のDNA断片の同一ポリアクリルアミドゲル上での泳動距離で描かれる標準線に基づき、切断DNA断片又はプラスミドの各DNA断片の大きさを算出する。プラスミドの大きさは、切断断片それぞれの大きさを加算して求める。なお、各DNA断片の大きさの決定において、1kb以上の断片の大きさについては、1%アガロースゲル電気泳動によつて得られる結果を採用し、約0.1kbから1kb未満の断片の大きさについては4%ポリアクリルアミドゲル電気泳動によつて得られる結果を採用した。

【0022】

【表1】

表 1

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
Kpn I	1	3.0、2.5
Sac I	1	1.7、3.8
EcoR I	1	0.6、4.9

上記表1中、3.0kbのKpn I 切断断片、1.7kbのSac I 切断断片もまたピオチンシンターゼをコードすることが確認されており、従つてこれらの切断断片もまた、本発明のピオチンシンターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片に包含されるものである。

【0023】かくして、ピオチンシンターゼをコードする遺伝子は、プレバクテリウム・フラバムMJ-233の染色体DNAを制限酵素Hind III およびKpn I で切り出すことにより得られる大きさが約3.0kbのDNA断片、および同染色体DNAを制限酵素Hind III

およびSac I で切り出すことにより得られる大きさが約1.7kbのDNA断片中に含まれているものと考えられる。

【0024】上記約3.0kbのDNA断片および約1.7kbのDNA断片を、さらに各種の制限酵素で切断したときの認識部位数および切断断片の大きさを、各々下記表2および表3に示す。

【0025】

【表2】

表 2

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
Sac I	1	1.7、1.3
EcoR I	1	0.6、2.4

【0026】

【表3】

表 3

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
Sph I	1	0.2、1.5
EcoR I	1	0.6、1.1
Sma I	1	1.0、0.7
Hinc II	1	1.5、0.2

一方、上記したプレバクテリウム・フラバムMJ-233の染色体DNAを制限酵素Hind III およびSac I で切り出すことにより得られる大きさが約1.7kbのDNA断片については、その塩基配列をプラスミドpUC18またはpUC19を用いるジデオキシヌクレオチド酵素法 (dideoxy chain termination 法) (Sanger, F. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 5463, 1977) により決定することができる。こ

のようにして決定した上記約1.7kbのDNA断片の塩基配列中のオープンリーディングフレームの存在から決定したピオチンシンターゼをコードする遺伝子 (b10B) は、次の配列を有しており、334のアミノ酸をコードする1002の塩基対から構成される：

【0027】

【化4】

(7)

特開平4-278088

11  
ATG ACA ATC CCC GCC ACC ATC CTT GAC ACC GGC CGC ACC CAA GTT CTG 48  
Met Thr Ile Pro Ala Thr Ile Leu Asp Thr Ala Arg Thr Gln Val Leu  
1 5 10 15  
GAA CAG GGA ATT GGC CTT AAT CAG CAG CAG TTG ATG GAG GTT CTC ACC 88  
Glu Gln Gly Ile Gly Leu Asn Gln Gln Gln Leu Met Gln Val Leu Thr  
20 25 30  
TTG CCT GAA GAG CAA ATC CCA GAC TTG ATG GAA TTA GCC CAC CAG GTT 144  
Leu Pro Glu Gln Gln Ile Pro Asp Leu Met Glu Leu Ala His Gln Val  
35 40 45  
CGG TTG AAG TGG TGT GGA GAG GAA ATC GAG GTA GAG GGC ATT ATT TCC 182  
Arg Leu Lys Trp Cys Gly Glu Glu Ile Gln Val Gln Gly Ile Ile Ser  
50 55 80  
CTC AAA ACT GGC GGT TGC CCT GAA GAT TGC CAT TTC TGC TCA CAG TCT 240  
Leu Lys Thr Gly Gly Cys Pro Glu Asp Cys His Phe Cys Ser Gln Ser  
65 70 75 80  
GGG TTG TTT GAA TCG CCG GTG GCT TCG GTG TGG CTG GAT ATT CGG AAT 288  
Gly Leu Phe Glu Ser Pro Val Ala Ser Val Trp Leu Asp Ile Pro Asn  
85 90 95  
CTC GTT GAA GCC CTT AAA CAG ACC GCA AAA ACT GGC GGT ACC GAA TTC 338  
Leu Val Glu Ala Ala Lys Gln Thr Ala Lys Thr Gly Ala Thr Glu Phe  
100 105 110  
GAT TTC GTC GCC TCA GTC AAG GGC CCT GAT GAG AGG CTC ATG ACC CAG 384  
Asp Phe Val Ala Ala Val Lys Gly Pro Asp Glu Arg Leu Met Thr Gln  
115 120 125  
CTG GAG GAA GCA CTC CTC GCG ATT CAC TCT GAA GTT GAA ATT GAA GTC 432  
Leu Glu Glu Ala Val Leu Ala Ile His Ser Gln Val Glu Ile Glu Val  
130 135 140  
GCA GCA TCG ATC GGA ACG TTA AAT AAG GAA CAG GTG GAT CGC CTC GCT 480  
Ala Ala Ser Ile Gly Thr Leu Asn Lys Glu Gln Val Asp Arg Leu Ala

30 【化5】

【0028】



13 14  
 145 150 155 160  
 GCT GCC GGC GTG CAC CGC TAC AAC CAT AAT TTG GAA ACT GCG CGT TCC 518  
 Ala Ala Gly Val His Arg Tyr Asn His Asn Leu Glu Thr Ala Arg Ser  
 165 170 175  
 TAT TTC CCT GAA GTT GTC ACC ACT CAT ACA TGG GAA GAG CGC CGC GAA 578  
 Tyr Phe Pro Glu Val Val Thr Thr His Thr Trp Glu Glu Arg Arg Glu  
 180 185 190  
 ACT TTG CGC CTG GTG GCA GAA GCT GGA ATG GAA GTC TGT TCC GCG GGA 624  
 Thr Leu Arg Leu Val Ala Glu Ala Gly Met Glu Val Cys Ser Gly Gly  
 195 200 205  
 ATC TTA GGA ATG GGC GAA ACT TTA GAG CAG CGC GCC GAG TTT GCG GTG 672  
 Ile Leu Gly Met Gly Glu Thr Leu Glu Gln Arg Ala Glu Phe Ala Val  
 210 215 220  
 CAG CTG GCG GAG CTT GAT CCC GAC GAA GTC CCC ATG AAC TTC CTT GAT 720  
 Gln Leu Ala Glu Leu Asp Pro Asp Glu Val Pro Met Asn Phe Leu Asp  
 225 230 235 240  
 CCT CGC CCG GGC ACC CCA TTT GCC GAT AGG AAT GTA TGG ACA GCC GTG 768  
 Pro Arg Pro Gly Thr Pro Phe Ala Asp Arg Asn Val Trp Thr Ala Val  
 245 250 255  
 ACG CTC TGG CCT CAT ATT GGT GCG TTC GCG CTT GCG ATG CCT GAC ACC 816  
 Thr Leu Trp Pro His Ile Gly Ala Phe Arg Leu Ala Met Pro His Thr  
 260 265 270  
 ATG CTT CGT TTT GCT GGC GGT GCG GAG CTG ACT TTG GGC GAC AAG GGT 864  
 Met Leu Arg Phe Ala Gly Gly Arg Glu Leu Thr Leu Gly Asp Lys Gly  
 275 280 285  
 TGC GAG CAA GCC CTC CTG GGA GGC ATC AAT GCG ATG ATC GTC GSA AAC 912  
 Ser Glu Gln Ala Leu Leu Gly Gly Ile Asn Ala Met Ile Val Gly Asn  
 290 295 300  
 TAC CTG ACC ACG CTC GGC CGC CCA ATG GAA GAT GAC CTC GAC ATG ATG 960  
 Tyr Leu Thr Thr Leu Gly Arg Pro Met Glu Asp Asp Leu Asp Met Met  
 305 310 315 320  
 GAT CGT CTC CAG CTG CCC ATC AAA GTC CTT AAT AAG GTC ATC TAA 1005  
 Asp Arg Leu Gln Leu Pro Ile Lys Val Leu Asn Lys Val Ile  
 325 330

【0029】

30 【化6】

【0030】上記の塩基配列を包含して成る本発明のピ  
 オチンシンターゼをコードする遺伝子を含むDNA断  
 片は、天然のコリネ型細菌染色体DNAから分離され  
 たもののみならず、通常用いられるDNA合成装置、例え  
 ばベックマン社製 System-1Plus を用いて合成されたも  
 のであつてもよい。

【0031】また、前記の如くブレバクテリウム・フ  
 ラバムMJ-233の染色体DNAから取得される本発  
 明のDNA断片は、ピオチンシンターゼをコードする  
 機能を実質的に損なうことがない限り、塩基配列の一部  
 の塩基が他の塩基と置換されていてもよく又は削除され  
 ていてもよく、或いは新たに塩基が挿入されていてもよ  
 く、さらに塩基配列の一部が転位されているものであつ  
 てもよく、これらの誘導体のいずれもが、本発明のピオ

チンシンターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片  
 に包含されるものである。

【0032】以上に詳述した大きさが約5.5kb、約3.  
 0kb、約1.7kbのDNA断片の制限酵素による切断点  
 地図を図1に示す。

【0033】本発明のピオチンシンターゼをコードす  
 る遺伝子を含むDNA断片(bioB断片)は、コリネ  
 型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を少  
 くとも含むプラスミドベクターに導入することにより、  
 コリネ型細菌内でピオチンシンターゼの高発現可能な  
 組換えプラスミドを得ることができる。

【0034】本発明のbioB断片を導入することがで  
 きる、コリネ型細菌内での複製増殖機能を司る遺伝子を  
 少くとも含むプラスミドベクターとしては、特願平2-

4212号明細書に開示されているプラスミドpCRY30; 特開平2-276575号公報に記載されているプラスミドpCRY21、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY3K7、pCRY3KE、pCRY3KX; 特開平1-191686号公報に記載されているプラスミドpCRY2及びpCRY3; 特開昭58-67679号公報に記載のpAM330; 特開昭58-77895号公報に記載のpHM1519; 特開昭58-192900号公報に記載のpAJ655、pAJ611及びpAJ1844; 特開昭57-134500号に記載のpCG1; 特開昭58-35197号公報に記載のpCG2; 特開昭57-183799号公報に記載のpCG4及びpCG11等を挙げることができる。

【0035】中でもコリネ型細菌の宿主ベクター系で用いられるプラスミドベクターとしては、コリネ型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子とコリネ型細菌内でプラスミドの安定化機能を司る遺伝子とをもつものが好ましく、例えばプラスミドpCRY30、pCRY21、pCRY2KE、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY3K7、pCRY3KE、pCRY3KXが好適に使用される。

【0036】上記プラスミドベクターpCRY30を調製する方法としては、プレバクテリウム・スタチオニス (*Brevibacterium stationis*) IFO12144 (FERMBP-2515) からプラスミドpBY503 DNAを抽出 (このプラスミドの詳細は特開平1-95785号公報参照) し、制限酵素XhoIで大きさが約4.0kbのプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を含むDNA断片を切り出し、制限酵素EcoRIおよびKpnIで大きさが約2.1kbのプラスミドの安定化機能を司る遺伝子を含むDNA断片を切り出す。これらの両断片をプラスミドpHSG298 (宝酒造製) のEcoRI、KpnI部位及びSalI部位に組み込むことにより、プラスミドベクターpCRY30を調製することができる。

【0037】次に、上記プラスミドベクターへの本発明のbioB断片の導入は、例えばプラスミドベクター中に1箇所だけ存在する制限酵素部位を、該制限酵素で開裂し、そこに前記bioB断片を必要に応じてS1ヌクレアーゼで処理して平滑末端とするか、または適当なアダプターDNAの存在下にDNAリガーゼ処理で連絡させることにより行うことができる。

【0038】プラスミドpCRY30への本発明のbioB断片の導入は、プラスミドpCRY30を制限酵素EcoRIで開裂させ、そこに前記ピオチンシンターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片 (bioB断片) をS1ヌクレアーゼで処理することにより平滑末端とした後、DNAリガーゼで連絡させることにより行うことができる。

【0039】このようにして造成されるプラスミドpC

RY30に本発明のbioB断片を導入した組換えプラスミドは、ピオチンシンターゼの製造に好適に用いることができる組換えプラスミドの一つであり、本発明者らはこれをプラスミドpCRY30-bio2と命名した。プラスミドpCRY30-bio2の作成方法の詳細については、後記実施例4及び5で説明する。

【0040】このプラスミドpCRY30-bio2の制限酵素切断点地図を図2に示す。このようにして造成されるピオチンシンターゼ遺伝子を含むコリネ型細菌内で複製増殖可能なプラスミドを、宿主微生物に導入し培養することにより、ピオチンシンターゼを安定に効率よく生産することが可能となる。

【0041】本発明によるプラスミドで形質転換しうる宿主微生物としては、コリネ型細菌、例えばプレバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERMBP-1497)、プレバクテリウム・フラバムMJ-233-AB-41 (FERMBP-1498)、プレバクテリウム・フラバムMJ-233-ABT-11 (FERMBP-1500)、プレバクテリウム・フラバムMJ-233-ABD-21 (FERMBP-1499) 等が挙げられる。

【0042】なお、上記のFERMBP-1498の菌株は、FERMBP-1497号の菌株を親株としてDL- $\alpha$ -アミノ酪酸耐性を積極的に付与されたエタノール酸化性微生物である (特公昭59-28398号公報第3~4欄参照)。また、FERMBP-1500号の菌株は、FERMBP-1497の菌株を親株としたL- $\alpha$ -アミノ酪酸トランスアミナーゼ高活性変異株である (特開昭62-51998号公報参照)。さらに、FERMBP-1499の菌株はFERMBP-1497の菌株を親株としたD- $\alpha$ -アミノ酪酸デアミナーゼ高活性変異株である (特開昭61-177993号公報参照)。

【0043】これらの微生物の他に、プレバクテリウム・アンモニアゲネス (*Brevibacterium ammoniagenes*) ATCC6871、同ATCC13745、同ATCC13746、プレバクテリウム・デバリカタム (*Brevibacterium divaricatum*) ATCC14020、プレバクテリウム・ラクtofアーメンタム (*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC13869、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC31831等を宿主微生物として用いることもできる。

【0044】なお宿主としてプレバクテリウム・フラバムMJ-233由来の菌株を用いる場合、本菌株が保有するプラスミドpBY502 (特開昭63-36787号公報参照) のため、形質転換が困難である場合があるので、そのような場合には、本菌株よりプラスミドpBY502を除去することが望ましい。そのようなプラスミドpBY502を除去する方法としては、例えば、

継代培養を繰り返すことにより、自然に欠失させることも可能であるし、人為的に除去することも可能である [Bact. Rev. 36 p. 361~405 (1972) 参照]。上記プラスミド pBY502 を人為的に除去する方法の一例を示せば次のとおりである。

【0045】宿主プレバクテリウム・フラバム MJ-233 の生育を不完全に阻害する濃度のアクリジンオレンジ (濃度: 0.2~50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) もしくはエチジウムブロミド (濃度: 0.2~50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 等を含む培地に、1ml 当たり約 10 細胞になるように接種し、生育を不完全に阻害しながら、約 24 時間約 35℃ で培養する。培養液を希釈後寒天培地に塗布し、約 35℃ で約 2 日培養する。出現したコロニーから各々独立にプラスミド抽出操作を行い、プラスミド pBY502 が除去されている株を選択する。この操作によりプラスミド pBY502 が除去されたプレバクテリウム・フラバム MJ-233 由来菌株が得られる。

【0046】このようにして得られるプレバクテリウム・フラバム MJ-233 由来菌株への前記プラスミドの形質転換法としては、エシエリヒア・コリ及びエルビニア・カロトボラについて知られているように [Calvin, N.M. and Hanawalt, P.C., Journal of Bacteriology, 170, 2796 (1988); Ito, K., Nishida, T. and Izaki, K., Agricultural and Biological Chemistry, 52, 293 (1988) 参照]、DNA 受容菌にパルス波を通電することによりプラスミドを導入することが可能である。

【0047】上記の方法で形質転換して得られるピオチンシンセターゼ産生能を有するコリネ型細菌、例えばプレバクテリウム・フラバム MJ-233 由来株の培養方法を以下に述べる。

【0048】培養は炭素源、窒素源、無機塩等を含む通常の栄養培地で行うことができ、炭素源としては、例えばグルコース、エタノール、メタノール、蔗糖蜜等が、そして窒素源としては、例えばアンモニア、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、尿素等がそれぞれ単独もしくは混合して用いられる。また無機塩としては、例えばリン酸二水素カリウム、リン酸二水素ナトリウム、硫酸マグネシウム等が用いられる。この他にペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー、カザミノ酸、ピオチン等の各種ビタミン等の栄養素を培地に添加することができる。

【0049】培養は、通常、通気攪拌、振盪等の好気的条件下に、約 20~40℃、好ましくは 25~35℃ の温度で行うことができる。培養途中の pH は 5~10、好ましくは 7~8 付近で行い、培養中の pH の調整は酸又はアルカリを添加して行うことができる。

【0050】培養開始時の炭素源濃度は、好ましくは 1~5 容量%、更に好ましくは 2~3 容量% である。また、培養期間は通常 1~7 日間とすることができ、最適

期間は 3 日間である。

【0051】このようにして得られる培養物から遠心分離等により菌体を取得することができる。

【0052】かくして培養された菌体は、野生株を培養した場合に比べて、ピオチンシンセターゼをその菌体内に多量含有している。菌体内に産生された、ピオチンシンセターゼの含量を調べる方法としては、例えば超音波処理、酵素処理、ホモジナイズ等の通常用いられる手段にて破砕し得られる無細胞抽出液を、SDS ゲル電気泳動法 [例えば、「蛋白質・酵素の基礎実験法」南江堂刊、314~333 頁等参照] に付することにより、菌体内の蛋白質を分離した後、Coomassie Brilliant Blue R-250 による染色法あるいは、銀染色法により染色した後、例えばフアルマシア社製 Ultro Scan XL レーザーデンストメーターを用いることにより、菌体中の各種タンパク質量を測定することができる。かくして、菌体内に産生された、ピオチンシンセターゼ含量の増加を測定することが可能である。

【0053】上記の如くピオチンシンセターゼを高含量含む菌体を用いることにより、少なくともデスチオピオチンを含有する前記通常の栄養培地で培養することにより、高効率でピオチンを製造することができる。

【0054】本明細書では、プレバクテリウム・フラバム MJ-233 からピオチンシンセターゼをコードする遺伝子 (b10B) を含む DNA 断片を単離し、該 DNA 断片を導入した組換えプラスミドを同じくプレバクテリウム・フラバム MJ-233 由来株へ導入し、該微生物によるピオチンシンセターゼの生産能の向上について主として詳述したが、プレバクテリウム・フラバム MJ-233 由来株の代りに前記した他のコリネ型細菌を用いても本発明の目的は達成される。

【0055】いわゆるコリネ型細菌は、コリネバクテリウム属やプレバクテリウム属等の種々の属名、種々の菌名が付されているが主な菌学的性質を同じくしている。これらの菌群は、細胞壁のアミノ酸構成や DNA の塩基組成が画一的であり、菌種間には 70~80% の DNA の相同性があり、非常に近縁な微生物であることは明らかである (Report of the Fermentation Research Institutes No. 55, p1-5, 1980, International Journal of Systematic Bacteriology Vol 31, p131-138, 1981 参照)。

【0056】また、ピオチン要求性のコリネ型細菌、例えばプレバクテリウム・フラバム MJ-233 (FERM BP-1497)、プレバクテリウム・ラクトファーマンタム ATCC 13869 およびコリネバクテリウム・グルタミカム ATCC 31831 について、ピオチン生合成に関与する各ステップの遺伝子が欠損したピオチン要求性大腸菌変異株 (Journal of Bacteriology, vol 112, p830-839, 1972 および Journal of Bacteriology, vol 94, p2065-20

19

66、1967参照)との交差相補性試験(Journal Bacteriology, vol 96, p515-524、1968参照)により、そのビオチン生合成系路について検討した結果、これら3種の菌株は同様にビメリルCoAシンセターゼをコードする遺伝子(bioC)および7-ケート-8-アミノペラルゴン酸シンセターゼをコードする遺伝子(bioF)が欠損しており、また少なくとも7,8-ジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼをコードする遺伝子(bioA)、デスチオビオチンシンセターゼをコードする遺伝子(bioD)およびビオチンシンセターゼをコードする遺伝子を保有していることが明らかとなった。これらの事実を踏まえれば、プレバクテリウム・フラバムMJ-233のみならず、コリネ型細菌全般から単離されたビオチンシンセターゼをコードする遺伝子(bioB)を含むDNA断片も本発明の範囲に含まれ、また、本発明のプラスミドで形質転換し得る宿主微生物は、プレバクテリウム・フラバムMJ-233に限らず、コリネ型細菌が全て含まれることは明らかである。

【0057】

【実施例】以上に本発明を説明してきたが、下記の実施例によりさらに具体的に説明する。しかしながら、実施例は本発明の具体的に認識を得る一助とみなすべきものであり、本発明の範囲を限定するためのものでないことを理解しなければならない。

【0058】

【実施例1】コリネ型細菌とビオチン要求性大腸菌変異株との相補性試験

(A) コリネ型細菌を含有するビオチン欠乏最少培地プレート

の作製  
半合成培地A培地[組成: 尿素2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  7g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5g、 $\text{MgSO}_4$  0.5g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  6mg、 $\text{MnSO}_4$  4~6mg、 $\text{H}_2\text{O}$  6mg、酵母エキス2.5g、カザミノ酸5g、ビオチン200 $\mu\text{g}$ 、塩酸チアミン200 $\mu\text{g}$ 、グルコース20g、純水1l]1lに、プレバクテリウム・フラバムMJ-233(FERM BP-1497)を接種して、O.D.が約2.9になるまで培養し、菌体を集めた。得られた菌体をBM緩衝液[組成: 尿素2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  7g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5g、 $\text{MgSO}_4$  0.5g]で2回洗浄した。この菌体を10mlのBM緩衝液に懸濁し、その内1mlを、滅菌後、50℃に放置しておいたビオチン検定用C培地(尿素0.2%、硫酸アンモニウム0.7%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.05%、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.05%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  6ppm、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim 6\text{H}_2\text{O}$  6ppm、チアミン $\cdot \text{HCl}$  100 $\mu\text{g}/\text{l}$ 、ピタミン・アツセイ用カザミノ酸0.1%、グルコース0.2%、寒天1.0%)に添加し、攪拌後、プレートに流し、固化した。

20

【0059】同様に、プレバクテリウム・フラバムMJ-233(FERM BP-1497)の代わりに、プレバクテリウム・ラクトファーマンタムATCC13869、あるいは、コリネバクテリウム・グルタミカムATCC31831を用いて各種のコリネ型細菌を含んだビオチン欠乏最少培地プレートを作製した。

(B) ビオチン要求性大腸菌変異株との相補性試験

ビオチン生合成系路の各ステップの欠損したビオチン要求性大腸菌変異株と各種コリネ型細菌との相補性試験により、各種コリネ型細菌のビオチン生合成系路を推定することができる。

【0060】上記(A)で作製した、3種のコリネ型細菌含有ビオチン欠乏最少培地のプレートに、各種ビオチン要求性大腸菌変異株を線状に接種した。用いたビオチン要求性大腸菌変異株は、エシエリヒア・コリ(Escherichia coli) R873(bioA4)、同R874(bioF12)、同R875(bioB17)、同R876(bioC18)、同R877(bioC19)である〔( )内は各菌株の遺伝子型(Genotype)を示す、またこれらの菌株の詳細および取得方法については、Journal of Bacteriology, vol 94, p2065-2066(1967)、Journal of Bacteriology, vol 112, p830-839(1972)参照〕。

【0061】これらのビオチン要求性大腸菌変異株とコリネ型細菌が相補した場合は、コリネ型細菌がビオチン欠乏最少培地のプレート中に生育し、黄色いコロニーを形成する。各種ビオチン要求性大腸菌変異株に対応するコリネ型細菌のコロニー形成の有無により、コリネ型細菌がビオチン生合成に関与する遺伝子のどの部分を欠損し、その部分を保有しているかを容易に判別することができる。

【0062】本相補試験の結果、プレバクテリウム・フラバムMJ-233(FERM BP-1497)、プレバクテリウム・ラクトファーマンタムATCC13869、コリネバクテリウム・グルタミカムATCC31831は、各菌株共、エシエリヒア・コリR873(bioA4)、同R875(bioB17)、同R877(bioD19)を相補したが、同R874(bioF12)、同R876(bioC18)を相補しなかった。即ち、各々のコリネ型細菌は、少なくとも、同様に7,8-ジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼをコードする遺伝子(bioA)、デスチオビオチンシンセターゼをコードする遺伝子(bioD)およびビオチンシンセターゼをコードする遺伝子(bioB)を有していることが明らかとなった。

【0063】

【実施例2】プレバクテリウム・フラバムMJ-233由来のビオチンシンセターゼをコードする遺伝子(bioB)を含むDNA断片のクローニング

(A) プレバクテリウム・フラバムMJ-233の全

## DNAの抽出

半合成培地A培地【組成：尿素2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  7g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5g、 $\text{MgSO}_4$  0.5g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  6mg、 $\text{MnSO}_4$  4~6 $\text{H}_2\text{O}$  6mg、酵母エキス2.5g、カザミノ酸5g、ピオチン200 $\mu\text{g}$ 、塩酸チアミン200 $\mu\text{g}$ 、グルコース20g、純水1l】1lに、プレバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497) を対数増殖期後期まで培養し、菌体を集めた。得られた菌体を10mg/mlの濃度にリゾチームを含む10mM NaCl-20mM トリス緩衝液 (pH 8.0) - 1mM EDTA-2Na 溶液15mlに懸濁した。次にプロテナーゼKを、最終濃度が100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように添加し、37℃で1時間保温した。さらにドデシル硫酸ナトリウムを最終濃度が0.5%になるように添加し、50℃で6時間保温して容菌した。この溶菌液に、等量のフェノール/クロロホルム溶液を添加し、室温で10分間ゆるやかに振盪した後、全量を遠心分離 (5,000 $\times$ g、20分間、10~12℃) し、上清画分を分取し、酢酸ナトリウムを0.3Mとなるように添加した後、2倍量のエタノールをゆつくりと加えた。水層とエタノール層の間に存在するDNAをガラス棒でまきとり、70%エタノールで洗浄した後、風乾した。得られたDNAに10mM トリス緩衝液 (pH 7.5) - 1mM EDTA-2Na 溶液5mlを加え、4℃で一晩静置し、以後の実験に用いた。

## 【0064】(B) 組換え体の創製

上記(A)項で得たプレバクテリウム・フラバムMJ-233の全DNA 90 $\mu\text{l}$ を制限酵素Sau 3A I 1 unitを用い、37℃で20分間反応させ部分分解した。この部分分解DNAにコスミドpWE15 (ストラダジーン社製) を制限酵素BamHIで切断した後、脱リン酸化処理したものを混合し、50mM トリス緩衝液 (pH 7.6)、10mM ジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl<sub>2</sub>及びT4 DNAリガーゼ1 unitの各成分を添加し (各成分の濃度は最終濃度である)、4℃で15時間反応させ、結合させた。

## 【0065】(C) ピオチン生合成に関与する酵素をコードする遺伝子を含むコスミドの選抜

上記(B)項で得たコスミド混液を用い、前記エシエリヒア・コリR875 (bioB17) 株を形質導入し、アンピリシン50mgを含む選択培地 [ $\text{K}_2\text{HPO}_4$  7g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1g、カザミノ酸10g、グルコース2g及び寒天16gを蒸留水1lに溶解] に塗抹した。なお形質導入には、宝酒造より販売されている $\lambda$  DNA in vitro Packaging Kit を用いて行つた。培地上の生育株を常

法により、液体培養し、培養液よりコスミドDNAを抽出し、該コスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、コスミドpWE15の長さ8.8kbのDNA断片に加え、長さ約30kbのDNA断片が認められた。本コスミドをpWE15-bio2と命名した。

【0066】(D) ピオチンシンセターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片 (bioB断片) のプラスミドpHSG399へのサブクローニング

上記(C)項で得たコスミドpWE15-bio2に含まれるDNA挿入断片は約30kbと大きく、実用的でないため、得られた断片のうち必要な部分だけに小型化するために、プラスミドpHSG399 (宝酒造より市販) へピオチンシンセターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を下記のとおりサブクローニングした。

【0067】上記(C)項で得たコスミドpWE15-bio2を制限酵素Hind IIIで切断したものと、プラスミドpHSG399を制限酵素Hind IIIで切断したものを混合し、50mM トリス緩衝液 (pH 7.6)、10mM ジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl<sub>2</sub>及びT4 DNAリガーゼ1 unitの各成分を添加し (各成分の濃度は最終濃度である)、12℃で15時間反応させ、結合させた。

【0068】得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム法 (Journal of Molecular Biology, 53, 159, 1970) によりエシエリヒア・コリR875 (bioB17) 株を形質転換し、クロラムフェニコール50mgを含む選択培地 [ $\text{K}_2\text{HPO}_4$  7g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1g、カザミノ酸10g、グルコース2g及び寒天16gを蒸留水1lに溶解] に塗抹した。

【0069】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミドpHSG399の長さ2.2kbのDNA断片に加え、長さ約5.5kbの挿入DNA断片が認められた。各種の制限で切断したときの、長さ約5.5kbのDNA断片の制限酵素認識部位数および切断断片の大きさは前記表1に示したとおりであった。このDNA断片の制限酵素切断点地図を図1に示す。

【0070】また上記で得たプラスミドを各種制限酵素で切断して、切断断片の大きさを測定した。その結果を下記の表4に示す。

【0071】

【表4】

表4 プラスミドpHSG399-bioB5.5

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
Hind III	2	5.5、2.2
Sac I	2	6.0、1.7

Kpn I

2

4.7、3.0

上記の制限酵素により特徴づけられるプラスミドをpHSG399-b1oB5.5と命名した。

【0072】以上により、ピオチンシンセターゼをコードする遺伝子(b1oB)を含む大きさが約5.5kbのDNA断片(Hind III断片)を得ることができた。

【0073】(E)ピオチンシンセターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片(b1oB断片)のプラスミドpBluescript IIへのサブクローニング

上記(D)項で得たプラスミドpHSG399-b1oB5.5は、b1oBを含む長さが約5.5kbの挿入DNA断片を有しているがさらに得られた断片のうち必要な部分だけに小型化するために、プラスミドpBluescript II(ストラタジーン社より市販)へピオチンシンセターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を下記のとおりサブクローニングした。

【0074】上記(D)項で得たプラスミドpHSG399-b1oB5.5を制限酵素Hind IIIおよびSac Iで切断したものと、プラスミドpBluescript IIを制限酵素Hind IIIおよびSac Iで切断したものを混合し、50mMトリス緩衝液(pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl<sub>2</sub>及びT4DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し(各成分の濃度は最終濃度である)、12℃で15時間反応させた。

表5 プラスミドpBS-b1oB-HS1.7

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ(kb)
Hind III	1	4.65
Sac I	1	4.65
Hinc II	1	4.65

上記の制限酵素により特徴づけられるプラスミドをpBS-b1oB-HS1.7と命名した。

【0079】以上により、ピオチンシンセターゼをコードする遺伝子(b1oB)を含む大きさが約1.7kbのDNA断片(Hind III-Sac I断片)を得ることができた。

【0080】

【実施例3】ピオチンシンセターゼをコードする遺伝子(b1oB)の塩基配列の決定実施例2の(E)項で得られたピオチンシンセターゼをコードする遺伝子(b1oB)を含む長さが約1.7kbのDNA断片について、

\*せ、結合させた。

【0075】得られたプラスミド混液を用い、前記の方法に従い前配エシエリヒア・コリR875(b1oB17)株を形質転換し、アンピシリン50mgを含む選択培地[K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2g、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1g、MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.1g、カザミノ酸10g、グルコース2g及び寒天16gを蒸留水1lに溶解]に塗抹した。

【0076】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミドpBluescript IIの長さ2.95kbのDNA断片に加え、長さ約1.7kbの挿入DNA断片が認められた。各種の制限酵素で切断したときの、長さ約1.7kbのDNA断片の制限酵素認識部位数および切断断片の大きさは前記表3に示したとおりであった。このDNA断片の制限酵素切断点地図を図1に示す。

【0077】また上記で得たプラスミドを各種制限酵素で切断して、切断断片の大きさを測定した。その結果を下記の表5に示す。

【0078】

【表5】

その塩基配列をプラスミドpUC18またはpUC19を用いるジデオキシヌクレオチド終止法(dideoxy chain termination法)(Sanger, F. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 5463, 1977)により図2に示した戦略図に従って決定した。その塩基配列中のオープンリーディングフレームの存在から、ピオチンシンセターゼをコードする遺伝子(b1oB)は、下記の配列を有する334のアミノ酸をコードする1002の塩基対より構成されていることが判明した。

【0081】

【化7】

25

26

【配列機】

配列番号: 1

配列の長さ: 1005

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: genomic DNA

経路

生物名: プレビバクテリウム フラバム (*Brevibacterium flavum*)

株名: NJ-233

配列の特徴

特徴を表す記号: peptide

存在位置: 1-1002

特徴を決定した方法: S

配列

ATG ACA ATC CCC GCC ACC ATC CTT GAC ACC GCC CGC ACC CAA GTT CTG 48

Met Thr Ile Pro Ala Thr Ile Leu Asp Thr Ala Arg Thr Gln Val Leu

1

5

10

15

GAA CAG GGA ATT GGC CTT AAT CAG CAG CAG TTG ATG GAG GTT CTC ACC 88

Glu Glu Gly Ile Gly Leu Asn Gln Gln Gln Leu Met Glu Val Leu Thr

20

25

30

TTG CCT GAA GAG CAA ATC CCA GAC TTG ATG GAA TTA CCC CAC CAG GTT 144

Leu Pro Gln Glu Gln Ile Pro Asp Leu Met Glu Leu Ala His Gln Val

35

40

45

CGG TTG AAG TGG TGT GGA GAG GAA ATC GAG GTA GAG GGC ATT ATT TCC 182

Arg Leu Lys Trp Cys Gly Glu Glu Ile Glu Val Glu Gly Ile Ile Ser

50

55

60

【0082】

30 【化8】

(15)

特開平4-278088

27

28

CTC AAA ACT GGC GGT TGC CCT GAA GAT TGC CAT TTC TGC TCA CAG TCT 240  
 Leu Lys Thr Gly Gly Cys Pro Glu Asp Cys His Phe Cys Ser Glu Ser  
 85 70 75 80  
 GGG TTG TTT GAA TCG CCG GTG GCT TCG GTG TGG CTG GAT ATT CCG AAT 288  
 Gly Leu Phe Glu Ser Pro Val Ala Ser Val Trp Leu Asp Ile Pro Asn  
 85 90 85  
 CTG GTT GAA GCC GCT AAA CAG ACC GCA AAA ACT GGC GCT ACC GAA TTC 330  
 Leu Val Glu Ala Ala Lys Glu Thr Ala Lys Thr Gly Ala Thr Glu Phe  
 100 105 110  
 GAT TTC GTC GCC GCA GTC AAG GGG CCT GAT GAG AAG CTC ATG ACC CAG 384  
 Asp Phe Val Ala Ala Val Lys Gly Pro Asp Glu Arg Leu Met Thr Glu  
 115 120 125  
 CTG GAG GAA GCA GTC CTC GCG ATT CAC TCT GAA GTT GAA ATT GAA GTC 432  
 Leu Glu Glu Ala Val Leu Ala Ile His Ser Glu Val Glu Ile Glu Val  
 130 135 140  
 GCA GCA TCG ATC GGA ACG TTA AAT AAG GAA CAG GTG GAT CCG CTC GCT 480  
 Ala Ala Ser Ile Gly Thr Leu Asn Lys Glu Glu Val Asp Arg Leu Ala  
 145 150 155 160  
 GCT GCC GGC GTG CAC CGC TAC AAC CAT AAT TTG GAA ACT GCG GGT TCC 528  
 Ala Ala Gly Val His Arg Tyr Asn His Asn Leu Glu Thr Ala Arg Ser  
 165 170 175  
 TAT TTC CCT GAA GTT GTC ACC ACT CAT ACA TGG GAA CAG CGC GCG GAA 576  
 Tyr Phe Pro Glu Val Val Thr Thr His Thr Trp Glu Glu Arg Arg Glu  
 180 185 190  
 ACT TTG CCG CTG GTG GCA GAA GCT GGA ATG GAA GTC TGT TCC GGC GGA 624  
 Thr Leu Arg Leu Val Ala Glu Ala Gly Met Glu Val Cys Ser Gly Gly  
 195 200 205  
 ATC TTA GGA ATG GGC GAA ACT TTA GAG CAG CGC GCC GAG TTT GCC GTG 672  
 Ile Leu Gly Met Gly Glu Thr Leu Glu Glu Arg Ala Glu Phe Ala Val

[0083]

30 【化9】



29  
210  
CAG CTG GCG GAG CTT GAT CCG GAC GAA GTC CCC ATG AAC TTC CTT GAT 720  
Gln Leu Ala Glu Leu Asp Pro Asp Glu Val Pro Met Asn Phe Leu Asp  
225  
230  
CCT CCG CCG GGC ACC CCA TTT GGC GAT AGG AAT GTA TGG ACA GGC GTG 788  
Pro Arg Pro Gly Thr Pro Phe Ala Asp Arg Asn Val Trp Thr Ala Val  
245  
250  
ACC CTC TGG CCT CAT ATT GGT GCG TTC CCG CTT GCG ATG CCT CAC ACC 816  
Thr Leu Trp Pro His Ile Gly Ala Phe Arg Leu Ala Met Pro His Thr  
260  
265  
ATG CTT CGT TTT GCT GGC GGT CCG GAG CTG ACT TTG GGC GAC AAG GGT 864  
Met Leu Arg Phe Ala Gly Gly Arg Glu Leu Thr Leu Gly Asp Lys Gly  
275  
280  
TCC GAG CAA GCG CTC CTG GGA GGC ATC AAT GCG ATG ATC GTC GGA AAC 912  
Ser Gln Gln Ala Leu Leu Gly Gly Ile Asn Ala Met Ile Val Gly Asn  
290  
295  
TAC CTG ACC ACG CTC GGC CCG CCA ATG GAA GAT GAC CTC GAC ATG ATG 960  
Tyr Leu Thr Thr Leu Gly Arg Pro Met Glu Asp Asp Leu Asp Met Met  
305  
310  
GAT CGT CTC CAG CTG CCC ATC AAA GTC CTT AAT AAG CTC ATC TAA 1005  
Asp Arg Leu Gln Leu Pro Ile Lys Val Leu Asn Lys Val Ile  
325  
330

【0084】

【実施例4】コリネ型細菌内で複製し安定なプラスミドベクターpCRY30の作成

(A) プラスミドpBY503の調製

プラスミドpBY503は、プレバクテリウム・スタチオニスIFO12144 (FERM BP-2515) から分離された分子量約10メガダルトンのプラスミドであり、特開平1-95785号公報に記載のようにして調製した。半合成培地A培地〔尿素2g、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 7g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5g、MgSO<sub>4</sub> 0.5g、FeSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 6mg、MnSO<sub>4</sub>・4~6H<sub>2</sub>O 6mg、酵母エキス2.5g、カザミノ酸5g、ピチオン200μg、塩酸チアミン200μg、グルコース20g及び純水1l〕1lに、プレバクテリウム・スタチオニスIFO12144を対数増殖期後期まで培養し、菌体を集めた。得られた菌体を10mg/mlの濃度にリゾチムを含む緩衝液〔25mMトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、10mMEDTA、50mMグルコース〕20mlに懸濁し、37℃で1時間反応させた。反応液にアルカリ-SDS液〔0.2N NaOH、1% (W/V) SDS〕40mlを添加し、緩やかに混和して室温にて15分間静置した。次に、この反応液に酢酸カリウム溶液〔5M酢酸カリウム溶液60ml、酢酸11.5ml、純水28.5mlの混合液〕30mlを添加し、充分混和してから氷水中に15分間静置した。

【0085】溶菌物全量を遠心管に移し、4℃で10分間、15,000×gの遠心分離にかけ、上澄液を得た。

【0086】これに等量のフェノール-クロロホルム液(フェノール:クロロホルム=1:1混和液)を加え懸濁した後、遠心管に移し、室温下で5分間、15,000×gの遠心分離にかけ、水層を回収した。水層に2倍量のエタノールを加え、-20℃で1時間静置後、4℃で10分間、15,000×gの遠心分離にかけ、沈澱を回収した。

【0087】沈澱を減圧乾燥後、TE緩衝液〔トリス10mM、EDTA1mM; HClにてpH8.0に調整〕2mlに溶解した。溶解液に塩化セシウム溶液〔5倍濃度のTE緩衝液100mlに塩化セシウム170gを溶解させた液〕15mlと10mg/mlエチジウムブロマイド溶液1mlを加えて、密度を1.392g/mlに合わせた。この溶液を12℃で42時間、116,000×gの遠心分離を行つた。

【0088】プラスミドpBY503は紫外線照射により遠心管内で下方のバンドとして見出しされる。このバンドを注射器で遠心管の側面から抜きとることにより、プラスミドpBY503を含む分画液を得た。

【0089】次いでこの分画液を等量のイソアミルアルコールで4回処理してエチジウムブロマイドを抽出除去し、その後TE緩衝液に対して透析を行つた。このようにして得られたプラスミドpBY503を含む透析液に3M酢酸ナトリウム溶液を最終濃度30mMに添加した後、2倍量エタノールを加え、-20℃1時間静置した。この溶液を15,000×gの遠心分離にかけてDNAを沈降させ、プラスミドpBY503を50μg得

50 た。

31

【0090】(B) プラスミドベクター pCRY30 の作成

プラスミド pHSG298 (宝酒造製) 0.5  $\mu$ g に制限酵素 Sal I (5 units) を 37℃ 1 時間反応させ、プラスミド DNA を完全に分解した。

【0091】前記 (A) 項で調製したプラスミド pBY503 の 2  $\mu$ g に制限酵素 Xho I (1 unit) を 37℃ で 30 分間反応させ、プラスミド DNA を部分分解した。

【0092】両者のプラスミド DNA 分解物を混合し、制限酵素を不活性化するために 65℃ で 10 分間加熱処理した後、該失活溶液中の成分が最終濃度として各々 50 mM トリス緩衝液 pH 7.6、10 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM ジチオスレイトール、1 mM ATP 及び T4 DNA リガーゼ 1 unit になるように各成分を強化し、16℃ で 15 時間保温した。この溶液を用いてエシエリヒア・コリ J M109 コンピテントセル (宝酒造製) を形質転換した。

【0093】形質転換株は 30  $\mu$ g/ml (最終濃度) のカナマイシン、100  $\mu$ g/ml (最終濃度) の IPTG (イソプロピル- $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド) 100  $\mu$ g/ml (最終濃度) の X-gal (5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド) を含む培地 (トリプトン 10g、酵母エキス 5g、NaCl 5g 及び純水 1l、pH 7.2) で 37℃ にて 24 時間培養し、生育株として得られた。これらの生育株のうち、白いコロニーで生育してきたものを選択し、各々プラスミドをアルカリ-SDS 法 [T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook, "Molecular cloning" (1982) p 90~91 参照] により抽出した。

【0094】その結果、プラスミド pHSG298 の Sal I 部位にプラスミド pBY503 由来の約 4.0 kb の断片が挿入されたプラスミド pHSG298-ori が得られた。

【0095】次に同様の方法を用い、前記 (A) 項で得られたプラスミド pBY503 DNA を制限酵素 Kpn I 及び EcoRI にて処理して得られる約 2.1 kb の DNA 断片を上記プラスミド pHSG298-ori の Kpn I 及び EcoRI 部位にクローニングし、プラスミドベクター pCRY30 を調製した。

【0096】

【実施例 5】プラスミド pCRY30-bio2 の作成及びコリネ型細菌への導入

実施例 2 の (E) 項で得られたプラスミド pBS-bioB-HS1.75  $\mu$ g を制限酵素 Hind III 及び Sac I を各々 5 unit づつ用い、37℃ で 1 時間反応さ

32

せ分解したものと、実施例 4 の (B) 項で得られたプラスミド pCRY30 1  $\mu$ g を制限酵素 EcoRI 1 unit を用い、37℃ で 1 時間反応させ分解したものを混合し、S1 スクレアーゼで処理することにより平滑末端とした後、50 mM トリス緩衝液 (pH 7.6)、10 mM ジチオスレイトール、1 mM ATP、10 mM MgCl<sub>2</sub> および T4 DNA リガーゼ 1 unit の各成分を添加し (各成分の濃度は最終濃度である)、12℃ で 15 時間反応させ結合させた。このプラスミドを用いて、前記方法に従いエシエリヒア・コリ R875 (bioB17) 株を形質転換し、カナマイシン 50  $\mu$ g/ml を含む選択培地 [K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2g、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1g、カザミノ酸 10g、グルコース 2g 及び寒天 16g を蒸留水 1l に溶解] に塗抹した。

【0097】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミド DNA を抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミド pCRY30 の長さ 8.6 kb の DNA 断片に加え、大きさ 1.7 kb の挿入 DNA 断片が認められた。

【0098】上記の如く調製されたプラスミド DNA を、コリネ型細菌へ形質転換した。

【0099】形質転換は、電気パルス法を用いて行つたプレバクテリウム・フラバム MJ-233 (FERM BP-1497) プラスミド pBY502 除去株を 100 ml の前記 A 培地で対数増殖初期まで培養し、ペニシリン G を 1 ユニット/ml になるように添加して、さらに 2 時間振盪培養し、遠心分離により菌体を集め、菌体を 20 ml のパルス用溶液 (272 mM Sucrose、7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1 mM MgCl<sub>2</sub>; pH 7.4) にて洗浄した。さらに菌体を遠心分離して集め、5 ml のパルス用溶液に懸濁し、0.75 ml の細胞と、前記で得られたプラスミド DNA 溶液 50  $\mu$ l とを混合し、水中にて 20 分間静置した。ジーンパルサー (バイオラド社製) を用いて、2500 ポルト、25  $\mu$ FD に設定し、パルスを印加後水中に 20 分間静置した。全量を 3 ml の前記 A 培地に移し 30℃ にて 1 時間培養後、カナマイシン 15  $\mu$ g/ml (最終濃度) を含む前記 A 寒天培地に植菌し 30℃ で 2~3 日間培養した。出現したカナマイシン耐性株より、前記実施例 4 (A) 項に記載の方法を用いてプラスミドを得た。このプラスミドを各種制限酵素で切断して、切断断片の大きさを測定した。その結果を下記の表 6 に示す。

【0100】

【表 6】

表 6 プラスミド pCRY30-bio2		
制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
Xho I	1	10.3
BamH I	1	10.3

33

Kpn I	1	10.3
Sac I	1	10.3
Sph I	2	8.6、1.7

上記制限酵素により特徴づけられるプラスミドをpCRY30-bio2と命名した。このプラスミドpCRY30-bio2の制限酵素地図を図3に示す。なお、プラスミドpCRY30-bio2により形質転換されたプレバクテリウム・フラバムMJ-233-bio2は、茨城県つくば市東1丁目1番3号の工業技術院微生物工業技術研究所に、平成3年2月26日付で：微工研菌寄第12040号（FERM P-12040）として寄託されている。

【0101】

【実施例6】プラスミドpCRY30-bio2の安定性

前記のA培地100mlを500ml容三角フラスコに分注し、120℃で15分間滅菌処理したものに、実施例5で得た形質転換株MJ-233-bio2を植菌し、30℃にて24時間振盪培養を行った後、同様にして調製したA培地100mlを500ml容三角フラスコに分注し、120℃で15分間滅菌したもの、1ml当たり50cellsの割合になるように植菌し、同じく30℃にて24時間振盪培養を行った。次に遠心分離して集菌し、菌体を洗浄後、カナマイシンを15μg/mlの割合で添加したA培地及び無添加のA培地を用いて調製した平板培地に一定量塗抹し、30℃にて1日培養後生育コロニーをカウントした。

【0102】この結果、カナマイシン添加および無添加培地に生育したコロニーは同数であること、さらにA培地生育コロニーは全てカナマイシン添加培地に生育すること、すなわち該プラスミドの高度の安定性を確認した。

【0103】

【実施例7】ピオチンシンセターゼの製造

培地（尿素0.2%、硫酸アンモニウム0.7%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05%、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05%、MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.05%、FeSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 6ppm、MnSO<sub>4</sub>・4~6H<sub>2</sub>O 6ppm、チアミン・HCl 100μg/l、及びピオチン200μg/l）100mlを500ml容三角フラスコに分注、滅菌（滅菌後pH7.0）した後、プレバクテリウム・フラバムMJ-233-bio2株を植菌し、無菌的にグルコースを最終濃度2%（W/V）なるように加え、30℃にて3日間振とう培養を行った。

【0104】対照としてプラスミドpCRY30-bio2を保持しないプレバクテリウム・フラバムMJ-233株を植菌し、同様に培養を行った。

【0105】培養液をベツクマン遠心機 Model J2-21を用いて、8000rpmで10分間、遠心し、菌体

34

を集菌する。本試量菌体約5mgに、0.5M Tris-HCl（pH6.8）を0.125ml、10%（W/V）SDSを0.200ml、β-メルカプトエタノールを0.050mlを添加し、水で全量を1.0mlに合わせる。この試料液を沸騰水中で約3分間処理する。上記の試料液1mlに対して、0.05%（W/V）BPBと70%（V/V）グリセロールを含む10mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0）の0.1mlを加えたものを泳動用試料液とする。

【0106】試料液を「第一化学薬品（株）」製SDS-PAGプレート10/20-1010を用い、試料を5μlアプライした後、60mAの定電流で、約60分間泳動する。

【0107】Coomassie Brilliant Blue R-250の0.25%（W/V）（正味の濃度）を含むエタノール-酢酸-水（9:2:9、V/V）混液にゲルプレートを浸して分離ゲル中の試料蛋白質の染色を行う。室温で約6時間染色した後、エタノール、酢酸、水（25:8:65、V/V）混液（脱色液）に浸し、軽く振盪し、直ちに、新しい脱色液と交換する。以後は、約1時間ごとに新しい脱色液と交換する。この脱色操作を分離ゲル中の蛋白質のバンドがかなり明瞭に見えるようになるまで繰り返す（3~5時間）。つぎに、分離ゲルをメタノール-酢酸-水（10:15:175、V/V）混液（保存液）に浸して、蛋白質の存在していない部分（バックグラウンド）を完全に脱色する。かくして、ゲル上に分子量約3万のタンパク質のバンドとして染色されていることにより、ピオチンシンセターゼが菌体内で産生されていることを確認することができる。このバンドの濃度を、ファルマシア社製「Ultro Scan XLレーザーデンスitometer」を用いて、測定した結果、プレバクテリウム・フラバムMJ-233-bio2株中に含まれるピオチンシンセターゼの含量は、pCRY30-bio2を保持しないプレバクテリウム・フラバムMJ-233株に比べて、約5倍に上昇していることが明らかとなった。

【0108】

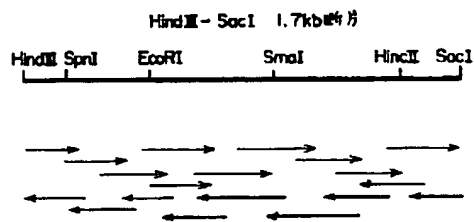
【発明の効果】本発明の新規なDNA断片は、コリネ型細菌のピオチン生合成に関与する酵素のうち、ピオチンシンセターゼをコードする遺伝子（bioB）を含むDNA断片であり、該DNA断片を含む本発明のプラスミドを用いることにより、コリネ型細菌に属する微生物の遺伝子操作による改良が可能となる。

【0109】また、このようにして改良された本発明のコリネ型細菌に属する微生物を培養することにより、微生物菌体内でピオチンシンセターゼの産生が増加し、該酵素の菌体内への高度蓄積が可能となる。

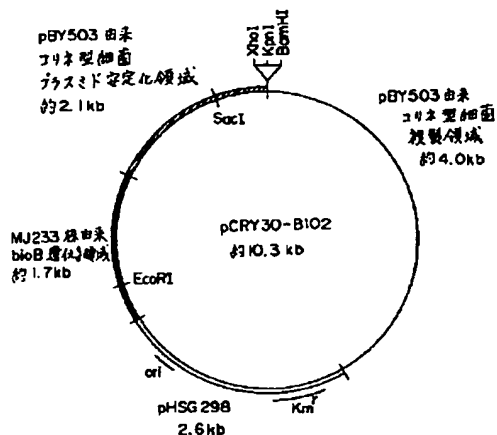
【図2】 大きさが約1.7kbの本発明DNA断片の塩基配列決定のための戦略図。

【図3】 本発明のプラスミドpCRY30-bio2の制限酵素切断点地図。

**【图 2】**



【图3】



(51) Int. Cl.<sup>6</sup>

庁内整理番号

### 技術表示箇所

C 1 2 R 1:13)

(C 1 2 N 15/52

C 1 2 R 1:15)

(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:13)

(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:15)

(C 1 2 N 9/00

C 1 2 R 1:13)

(C 1 2 N 9/00

C12R 1:15)

(72)発明者 小林 幹  
茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号三  
菱油化株式会社筑波総合研究所内

(72)発明者 久留主 泰朗  
茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号三  
菱油化株式会社筑波総合研究所内  
(72)発明者 湯川 英明  
茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号三  
菱油化株式会社筑波総合研究所内